

Pengaruh Kombinasi Konsentrasi Media Ekstrak Tauge (MET) dengan Pupuk Urea terhadap Kadar Protein *Spirulina* sp.

Dwi Riesya Amanatin dan Tutik Nurhidayati

Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)

Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111

E-mail: tutik@bio.its.ac.id

Abstrak—Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kombinasi konsentrasi Media Ekstrak Tauge (MET) dan pupuk urea yang dapat menghasilkan kadar protein *Spirulina* sp. tertinggi. Kultur *Spirulina* sp. yang telah memasuki fase puncak pertumbuhan dipanen dengan metode filtrasi dan dianalisa kadar protein kasar dengan metode Kjeldhal. Kombinasi MET dengan pupuk urea terdiri dari P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9 dan P10 sebagai kontrol yang menggunakan pupuk walne. Hasil penelitian yang dianalisa dengan Dunnet menunjukkan bahwa P5 memiliki perbedaan nyata terhadap kontrol dengan kadar protein tertinggi dibandingkan dengan perlakuan yang lain yaitu sebesar 20,99%.

Kata Kunci— Media Ekstrak Tauge (MET), Pupuk Urea, *Spirulina* sp., Kadar protein.

I. PENDAHULUAN

Spirulina Sp. merupakan cyanobacteria yang banyak dimanfaatkan sebagai bahan baku industri makanan karena mengandung protein 60–71%, lemak 8%, karbohidrat 16%, dan vitamin serta 1,6% *Chlorophyll-a*, 18% *Phycocyanin*, 17% β -Carotene, dan 20 – 30 % γ -linoleic acid dari total asam lemak [1]. *Spirulina* sp. juga telah digunakan sebagai suplemen atau makanan pelengkap oleh penduduk Afrika sebagai sumber makanan tradisional [2]. Kandungan nutrisi *Spirulina* sp. yang lengkap terutama protein yang tinggi menyebabkan *Spirulina* sp. memiliki potensi yang besar untuk dimanfaatkan sebagai sumber protein.

Pemenuhan kebutuhan nutrisi untuk *Spirulina* sp. sangat bergantung pada ketersediaannya dalam medium kultur. Komposisi nutrisi yang lengkap dan konsentrasi nutrisi yang tepat menentukan produksi biomassa dan kandungan gizi mikroalga. Jenis pupuk yang banyak dipilih masyarakat dalam kultur *Spirulina* sp. adalah jenis PA (Pro Analisis) yang sudah distandarkan seperti pupuk Walne, Guillard, dll. Mahalnya harga pupuk jenis PA menjadi dasar pencarian pupuk alternatif pada kultur *Spirulina* sp. yang mampu menghasilkan nutrisi serta kepadatan sel yang tinggi, dengan harga yang ekonomis dan mudah diperoleh oleh masyarakat. Salah satu contohnya adalah media ekstrak tauge (MET).

Penambahan ekstrak tauge (MET) telah diaplikasikan pada mikroalga marga *Chlorella* spp. [3] dan *Scenedesmus* sp. [4]. Media tersebut mengandung unsur makro terutama fosfat dalam jumlah yang tinggi. Selain itu dilengkapi pula dengan unsur mikro, mineral, asam amino dan vitamin (tiamin, riboflavin, piridoksin, triptofan, asam pantotenat, vitamin K dan vitamin C) yang berperan sebagai *growth factor* dalam pertumbuhan alga [5].

Selain fosfat, unsur makro lain yang mendukung penyusunan senyawa dalam sel, termasuk protein dan klorofil untuk fotosintesis *Spirulina* sp. adalah nitrogen. [6]. Namun unsur nitrogen ini tidak tersedia dalam MET, sehingga diperlukan penambahan jenis pupuk lain sebagai sumber nitrogen yaitu pupuk urea. Urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) merupakan pupuk komersil yang ekonomis serta memiliki kandungan Nitrogen yang tinggi mencapai 46% [7]. Apabila urea terlarut akan terbentuk ion amonium (NH_4^+) yang akan diasimilasi oleh mikroalga dan diubah menjadi glutamat sebagai salah satu penyusun asam amino [8]. Pengaruh pupuk urea sebagai sumber nitrogen dalam kultur mikroalga telah diaplikasikan pada *Scenedesmus* sp. yang menunjukkan peningkatan pertumbuhan sel [9]. Melalui kombinasi MET dan pupuk urea yang sesuai diharapkan dapat memberikan solusi berupa pupuk alternatif yang ekonomis dalam kultur *Spirulina* sp. sebagai *super food* dalam penanggulangan ancaman gizi buruk dan kerawanan pangan di Indonesia.

II. METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan pada bulan Februari sampai Maret 2013 di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan Program Studi Biologi ITS dan Laboratorium Pakan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Isolat *Spirulina* sp. diperoleh dari Balai Budidaya Air Payau (BBAP) Situbondo. Media dasar air laut yang digunakan diperoleh dari perairan Pantai Kenjeran Surabaya. Kemudian salinitas air laut dibuat 20‰ dengan menambahkan aquades. Sedangkan pupuk yang ditambahkan pada media kultur *Spirulina* sp. terdiri dari kombinasi konsentrasi Media Ekstrak Tauge (MET) dengan pupuk urea dan kontrol berupa pupuk walne.

Pembuatan Media Ekstrak Tauge (MET) dilakukan dengan merebus 500 gram tauge kacang hijau dalam 2500 ml aquades yang mendidih selama 1 jam, kemudian disaring dengan kassa dan kapas. Konsentrasi MET yang digunakan yaitu: 2%, 4%, dan 6% dibuat dari larutan stok (v/v) [4]. MET yang telah dibuat kemudian dikombinasikan dengan pupuk urea komersil yang berbentuk serbuk, dengan dosis 80 ppm, 100 ppm, dan 120 ppm pada media dasar air laut sebagaimana tabel 1.

Starter *spirulina* sp. dibuat dengan menumbuhkan *Spirulina* pada media air laut hingga mencapai fase pertumbuhan eksponensial. Setelah itu diinokulasikan ke dalam media perlakuan P1 sampai dengan P10 sebanyak 10% dari volume media kultur.

Pemanenan *Spirulina* sp. dilakukan saat kultur mencapai puncak populasi melalui metode filtrasi menggunakan plankton net dengan mesh size 0,060 mm. *Spirulina* sp. yang diperoleh kemudian dianalisis kandungan protein dengan metode Kjeldhal.

Parameter pengamatan dalam penelitian ini meliputi pengukuran OD (*Optical density*) *Spirulina* sp. menggunakan spektrofotometer serta pengukuran kualitas air yang meliputi suhu, salinitas dan pH yang dilakukan setiap 24 jam. Pengukuran suhu menggunakan termometer, pengukuran salinitas menggunakan refraktometer, dan pengukuran pH menggunakan pH indicator.

Data penelitian berupa kadar protein *Spirulina* sp. dianalisa dengan Anova dan uji Dunnet dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$).

II. HASIL DAN DISKUSI

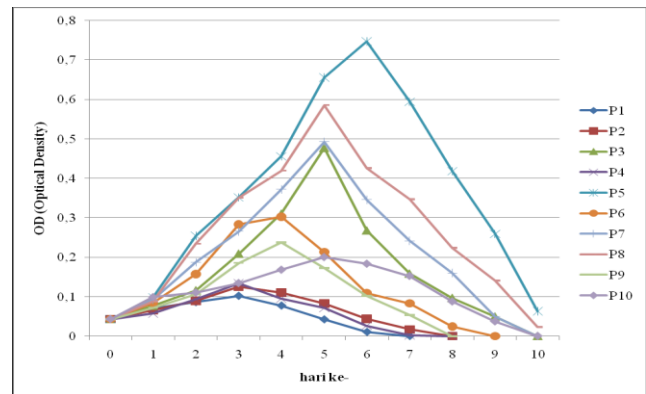
Spirulina sp. yang dikultur pada perlakuan penambahan pupuk kombinasi konsentrasi MET dengan pupuk urea dan perlakuan kontrol (walne) memiliki pola pertumbuhan dengan puncak populasi yang berbeda-beda. Kurva pertumbuhan *Spirulina* sp. pada masing-masing perlakuan dapat dilihat pada gambar 1.

Berdasarkan gambar 1 dapat diketahui bahwa perlakuan P5 memiliki kelimpahan sel tertinggi dengan hasil pengukuran OD sebesar 0,747, dan terendah terdapat pada perlakuan P1 dengan kisaran OD 0,102. Sementara perlakuan P10 menggunakan pupuk *walne* memiliki nilai OD 0,200. Selain itu, pada kurva pertumbuhan *Spirulina* sp. pada gambar 1 dapat diketahui pula bahwa perlakuan P10 memiliki pola pertumbuhan yang lebih lama dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Hal ini disebabkan karena pupuk *walne* merupakan pupuk yang biasa digunakan sebagai media kultur *Spirulina* sp., sehingga *Spirulina* sp. telah teradaptasi untuk tumbuh dalam media yang diberi pupuk *walne*. Namun setelah memasuki fase adaptasi, *Spirulina* sp. membutuhkan nutrisi yang cukup banyak untuk melakukan pertumbuhan hingga mencapai fase puncak populasi. Sedangkan pada pupuk *walne* umumnya memiliki kandungan unsur hara yang relatif lebih rendah dibandingkan dengan media kultur yang lainnya, seperti kandungan Nitrogen dalam bentuk $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ hanya sebesar 0,009 mg/liter yang tersedia hanya dalam jumlah sedikit. Nitrogen merupakan unsur yang dibutuhkan dalam pertumbuhan sel *Spirulina* sp. [10].

Sementara pada perlakuan P5 dengan komposisi 100 ppm urea dengan 4% MET memiliki puncak pertumbuhan yang paling tinggi dengan OD mencapai 0,747. Sedangkan puncak pertumbuhan *Spirulina* sp. terendah terdapat pada perlakuan P1 (MET 2% dan pupuk Urea 80 ppm) dengan OD sebesar 0,102. Hal ini disebabkan karena nitrogen merupakan unsur hara yang diperlukan dalam pembentukan klorofil, dimana klorofil sangat dibutuhkan untuk proses fotosintesis. Ketika unsur nitrogen diturunkan konsentrasinya maka pembentukan klorofil menjadi terhambat yang mengakibatkan proses fotosintesis menjadi terhambat. Terhambatnya proses fotosintesis tersebut

Tabel 1. Kombinasi MET dengan pupuk urea

Pupuk	Keterangan
P1	MET 2% pupuk urea 80 ppm
P2	MET 2% pupuk urea 100 ppm
P3	MET 2% pupuk urea 120 ppm
P4	MET 4% pupuk urea 80 ppm
P5	MET 4% pupuk urea 100 ppm
P6	MET 4% pupuk urea 120 ppm
P7	MET 6% pupuk urea 80 ppm
P8	MET 6% pupuk urea 100 ppm
P9	MET 6% pupuk urea 120 ppm
P10	Pupuk walne



Gambar 8. Kurva pertumbuhan *Spirulina* sp. pada masing-masing perlakuan.

Keterangan:

Pupuk 1 (P1) : MET 2% pupuk urea 80 ppm
 Pupuk 2 (P2) : MET 2% pupuk urea 100 ppm
 Pupuk 3 (P3) : MET 2% pupuk urea 120 ppm
 Pupuk 4 (P4) : MET 4% pupuk urea 80 ppm
 Pupuk 5 (P5) : MET 4% pupuk urea 100 ppm
 Pupuk 6 (P6) : MET 4% pupuk urea 120 ppm
 Pupuk 7 (P7) : MET 6% pupuk urea 80 ppm
 Pupuk 8 (P8) : MET 6% pupuk urea 100 ppm
 Pupuk 9 (P9) : MET 6% pupuk urea 120 ppm
 Kontrol (P10) : pupuk *walne*



Gambar 9. Kultur *Spirulina* sp. pada masing-masing perlakuan.

Tabel 2. Hasil uji Dunnet kadar Protein *Spirulina* sp.

Pupuk	Perlakuan	Kadar protein
P1	2% taug 80 ppm urea	6,737 a
P2	2% taug 100 ppm urea	7,167 a
P3	2% taug 120 ppm urea	13,422
P4	4% taug 80 ppm urea	7,488 a
P5	4% taug 100 ppm urea	20,997
P6	4% taug 120 ppm urea	11,849
P7	6% taug 80 ppm urea	13,712
P8	6% taug 100 ppm urea	14,623
P9	6% taug 120 ppm urea	8,032 a
P10	Walne	7,987 a

Keterangan : huruf yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata berdasarkan uji Dunnet dengan taraf kepercayaan 95%

mengakibatkan pertumbuhan *Spirulina* sp. menjadi terhambat pula.

Pertumbuhan *Spirulina* sp. yang rendah juga terjadi pada perlakuan dengan konsentrasi nitrogen yang tinggi

(pupuk Urea lebih dari 100 ppm). Hal ini disebabkan karena adanya batas maksimum penggunaan nutrisi dari medium oleh sel sehingga terjadi penghambatan proses biosintesisnya terutama biosintesis protein.

Berdasarkan hasil analisis (ANOVA) dengan $P < 0,05$ menunjukkan bahwa terdapat pengaruh kombinasi konsentrasi MET dan urea terhadap kadar protein *Spirulina* sp. Sementara berdasarkan uji Dunnett menunjukkan hasil sebagaimana pada tabel 1.

Hasil pengujian kadar protein kasar *Spirulina* sp. pada gambar 10 dapat diketahui bahwa perlakuan P5 dengan komposisi MET 4% dan Urea 100 ppm menunjukkan kadar protein yang tertinggi sebesar 20,99%. Hal ini disebabkan karena perlakuan P5 yang mengalami puncak pertumbuhan pada hari keenam, memiliki kelimpahan sel yang paling tinggi dibandingkan perlakuan lain.

Kandungan protein yang tinggi pada perlakuan P5 tersebut menunjukkan bahwa nutrisi yang terdapat pada media kultur *Spirulina* sp. tersebut telah sesuai dengan kebutuhan nutrisi *Spirulina* sp. Perlakuan P5 tersebut juga menunjukkan bahwa unsur Nitrogen yang terdapat pada Pupuk Urea telah menjalankan fungsinya dengan baik, yang ditunjukkan dengan tingginya kelimpahan sel serta kadar protein *Spirulina* sp. Nitrogen merupakan makronutrien yang mempengaruhi pertumbuhan *Spirulina* sp. dalam aktifitas metabolisme sel seperti katabolisme maupun asimilasi khususnya biosintesis protein [10]. Nitrogen juga merupakan bahan penting penyusun asam amino, amida, nukleotida, dan nukleo protein, serta esensial untuk membelah sel sehingga nitrogen penting untuk pertumbuhan [11]. Berdasarkan hal tersebut, maka pada saat konsentrasi nitrogen dalam media kultur optimal, Aktifitas metabolisme sel juga berjalan dengan baik, termasuk sintesis klorofil, karena kandungan klorofil yang tinggi akan menyebabkan proses fotosintesis dapat berjalan dengan baik dan pertumbuhan *Spirulina* sp. akan lebih optimal.

Namun di sisi lain, jika dalam media kultur *Spirulina* sp. kekurangan unsur nitrogen seperti pada perlakuan dengan dosis pupuk Urea kurang dari 100 ppm dikombinasikan dengan MET 2%, 4% dan 6% memiliki kadar protein yang rendah. Hal ini disebabkan karena kurangnya unsur N, mengingat nitrogen merupakan nutrisi yang banyak dibutuhkan untuk pertumbuhan *Spirulina* sp. [12], serta sebagai unsur penting dalam pembentukan klorofil [13].

Kadar protein yang rendah juga terjadi apabila nitrogen dalam media kultur *Spirulina* sp. berlebih, seperti pada perlakuan P3, P6 dan P9. Hal ini disebabkan karena penyerapan ammonium lebih mudah dilakukan oleh *Spirulina* sp. daripada nitrat (NO_3), karena ammonium dapat melalui membran sel secara langsung. Selain itu MET yang dikombinasikan dengan pupuk urea juga mempunyai banyak peranan diantaranya: Mangan (Mn) sebagai komponen struktural membran kloroplas [14] dan merupakan aktivator enzim pada reaksi berantai fotosintesis [4], magnesium (Mg) berperan sebagai kofaktor dalam pembentukan asam amino dan klorofil [14], Besi (Fe) berperan dalam sintesis klorofil dan sintesis protein-protein penyusun kloroplas, Seng (Zn) diperlukan dalam proses pembentukan klorofil dan mencegah kerusakan molekul klorofil [15].

Sedangkan apabila dalam media kultur kekurangan mikronutrien dalam bentuk Mn dapat mempengaruhi proses fotosintesis karena Mn merupakan aktivator enzim pada

proses fotosintesis [14]. Karbohidrat yang dihasilkan melalui proses fotosintesis selain digunakan untuk pertumbuhan juga untuk respirasi seluler. Apabila hasil fotosintesis berkurang maka karbohidrat yang tersisa setelah sebagian digunakan dalam proses respirasi tidak mencukupi untuk pertumbuhan sel [4].

Hasil pengukuran parameter kualitas air pada kultur *Spirulina* sp. dengan pupuk kombinasi MET (Media Ekstrak Tauge) dan pupuk Urea serta kontrol menunjukkan nilai suhu, salinitas dan pH yang berbeda. Hasil pengukuran suhu menunjukkan bahwa suhu media berkisar antara 20°C - 26°C . [16] menyatakan, suhu optimal untuk *Spirulina* sp. adalah 32°C - 35°C . Berdasarkan hal tersebut dapat diketahui bahwa suhu pada media kultur *Spirulina* sp. pada perlakuan P1 hingga P10 tidak menunjukkan kondisi suhu optimal yang mendukung pertumbuhan, karena hasil pengukuran suhu hanya mencapai 26°C . Selain itu pada gambar 10 dapat diketahui pula bahwa perlakuan P5 dengan kelimpahan sel paling tinggi memiliki suhu media tertinggi dibandingkan perlakuan yang lain. Hal tersebut dapat terjadi karena tingginya kelimpahan sel *Spirulina* sp., mengingat suhu merupakan parameter fisika yang mempengaruhi aktivitas metabolisme organisme. Suhu juga dapat berpengaruh terhadap kehidupan dan pertumbuhan biota air [17].

Hasil pengukuran Nilai salinitas media kultur berkisar antara 20‰ - 27‰. [18] menyatakan bahwa salinitas yang optimal untuk pertumbuhan *Spirulina* sp. adalah berkisar antara 15-30 ‰. Sementara hasil pengukuran pH media tumbuh *Spirulina* sp. pada masing-masing perlakuan menunjukkan nilai pH 7 hingga 8. Peningkatan nilai pH pada media perlakuan pH disebabkan karena terjadinya penguraian protein dan senyawa nitrogen lain. Amonium (NH_4^+), merupakan bentuk senyawa nitrogen organik yang telah mengalami penguraian [3]. Amonium dihasilkan melalui proses disosiasi amonium hidroksida. Amonium hidroksida merupakan amonia yang terlarut dalam air. Menurut [19], reaksi pembentukan amonium adalah sebagai berikut: $\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$. Bila reaksi di atas bergerak ke kanan maka konsentrasi amonium di dalam media akan meningkat dan pH media menjadi basa. Menurut [20], pH yang tidak dapat meningkat lagi disebabkan adanya sistem *buffer* alami berupa gas CO_2 terlarut yang terdapat dalam media kultur. Gas CO_2 terlarut yang terdapat dalam media akan menjadi asam karbonat yang akan terurai menjadi ion-ion karbonat dan ion bikarbonat. Reaksi kesetimbangan antara CO_2 terlarut, asam karbonat, ion bikarbonat, dan ion karbonat akan menyebabkan nilai pH bergeser pada kisaran 7-8 dan tidak meningkat lagi. Pengontrolan pH pada suatu media kultur sangat penting untuk menjaga keseimbangan pertumbuhan sel *Spirulina* sp. [16] menyebutkan bahwa pH yang baik untuk pertumbuhan *Spirulina* sp. berkisar antara 7-11.

III. KESIMPULAN

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini yaitu kombinasi konsentrasi Media Ekstrak Tauge (MET) dengan pupuk urea yang dapat menghasilkan kadar protein tertinggi adalah pada perlakuan P5 yang memiliki komposisi 100 ppm pupuk urea dan 4% MET, dengan kadar protein sebesar 20,997%.

IV. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis D.R.A mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan tinggi yang telah memberikan dukungan dana penelitian melalui program kreativitas Mahasiswa bidang Penelitian tahun 2012-2013.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Jongkon P., Siripen T dan Richard D. L. 2008. *Phytoremediation of Kitchen Wastewater by Spirulina platensis (Nordstedt) Geiteler: Pigment content, Production Variable Cost and Nutritional Value*. Maejo International Journal of Science and Technology. Vol. 2 No. 02 hal. 159 – 171.
- [2] Susanna D., Zakianis, Hermawati E., Adi H. K. 2007. *Pemanfaatan Spirulina platensis sebagai Suplemen Protein Sel Tunggal (PST) Mencit (Mus musculus)*. Makara Kesehatan Vol. 11, No. 1 hal. 45.
- [3] Prihantini, N. B., Berta P. dan Ratna Y. 2005. *Pertumbuhan Chlorella spp. dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) dengan Variasi pH Awal*. Makara Sains Vol. 9, No. 1 hal. 1.
- [4] Prihantini, Nining Betawi *et al.*, 2007. *Pengaruh Konsentrasi Medium Ekstrak Tauge (MET) Terhadap Pertumbuhan Scenedesmus Isolasi Subang*. Makara Sains Vol. 11 No. 1 hal. 1.
- [5] Anonim. 2004. *Danish Food Corporation*. foodcop.dk/fcbd.det [28 Juni 2012].
- [6] Chrismadha, T., Lily P. dan Yayah M. 2006. *Pengaruh Konsentrasi Nitrogen dan Fosfor terhadap Pertumbuhan, Kandungan Protein, Karbohidrat dan Fikosianin pada Kultur Spirulina fusiformis*. Berita Biologi Vol. 8 No. 3.
- [7] Anonim. 2009. *Urea*. www.pupukkaltim.com [02 September 2012].
- [8] Laura, B dan Paolo G. 2006. *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton New York.
- [9] Goswami, Chandra D. 2011. *Scenedesmus dimorphus and Scenedesmus quadricauda : Two Potent Indigenous Microalgae Strains for Biomass Production and CO₂ Mitigation - A Study on their Growth Behavior and Lipid Productivity under Different Concentration of Urea as Nitrogen Source*. Journal of Algal Biomass Utilization Vol. 2 No. 4 Hal 2-4.
- [10] Borowitzka, A.M., dan Lesly B. J. 1988. *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, Australia.
- [11] Gardner FP., Pierce RB, Mitchell RL. 1991. *Fisiologi Tanaman Budidaya*. UI Press, Jakarta.
- [12] Wijaya. S. A. 2006. *Pengaruh Pemberian Konsentrasi Urea yang Berbeda Terhadap pertumbuhan Nannochloropsis oculata*. Skripsi. Program Studi Budidaya Perairan. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. hal. 2-3.
- [13] Isnansetyo, A dan Kurniastuti, 1995. *Teknik Kultur Phytoplankton dan Zooplankton Pakan Alami Untuk Pembenihan Organisme Laut*. Kanisius, Yogyakarta.
- [14] Laura, B dan Paolo G. 2006. *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton New York.
- [15] Bidwell, R.G.S. 1979. *Plant physiology*. 2nd ed. Mac Millan Publishing, New York.
- [16] Ciferri, O. 1983. *Spirulina, The Edible Microorganism*. Microbiological Reviews. Vol. 47 No. 4 hal 558-570.
- [17] Suminto. 2009. *Penggunaan Jenis Media Kultur Teknis terhadap Produksi dan Kandungan Nutrisi Sel Spirulina platensis*. Jurnal Saintek Perikanan Vol. 4, No. 2 hal. 53-54.
- [18] Utomo N. B. P., Winarti dan Erlina A. 2005. *Pertumbuhan Spirulina platensis yang dikultur dengan Pupuk Inorganik (Urea, TSP dan ZA) dan Kotoran Ayam*. Jurnal Akuakultur Indonesia. Vol. 4 No. 1
- [19] Goldman C.R. dan A. J. Horne. 1983. *Limnology*. McGraw-Hill, Inc., Auckland.
- [20] Cole G.A. 1994. *Textbook of Limnology*. Waveland Press Inc., Illinois.